

REF 425-2000

L25200001ES00

Autoimmune EIA

Anti-Cardiolipin IgG Test

Manual de instrucciones

Autoimmune EIA
Anti-Cardiolipin IgG Test Kit, 96 Tests

IVD

CE

Mfd. For *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547, USA*
EC REP ***FRANCE,*** *Bio-Rad, Marnes-la-Coquette*



CD en varios idiomas

Este kit incluye un CD-ROM en los siguientes idiomas:
inglés, alemán, francés, español, italiano, portugués, sueco, danés y griego.

Símbolos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro

CE • European Conformity • EG-Konformität • Conformité européenne • Conforme a la normativa europea • Conformità Europea • Conformidade com as normas europeias • Uppfyller EU-direktiv • CE-mærkning • Συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς	• Manufacturer • Hersteller • Fabricant • Fabricante • Produttore • Fabricante • Tillverkare • Producent • Κατασκευαστής	EC REP • Authorized Representative in the European Union • Autorisierter Vertreter in der Europäischen Union • Représentant agréé pour l'Union Européenne • Representante Autorizado en la Unión Europea • Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea • Representante Autorizado da União Europeia • Auktoriserad EU-representant • Autoriseret repræsentant i EU • Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Ένωση
LOT • Lot Number • Chargenbezeichnung • Numéro de lot • Número de lote • Numero di lotto • Número do lote • Batchnummer • Lotnummer • Αριθμός παρτίδας	• Use by • Haltbar bis • Utiliser avant • Fecha de caducidad • Scadenza • Utilizar até • Användes före • Udløbsdato • Ημερομηνία λήξης	IVD • For In Vitro Diagnostic Use • In-vitro-Diagnostikum • Utilisation comme test de diagnostic in vitro • Para uso en diagnóstico in vitro • Per uso diagnostico in vitro • Para uso em diagnóstico in vitro • För in vitro-diagnostiskt bruk • Til in vitro-diagnostisk brug • Για in vitro διαγνωστική χρήση
• Temperature Limit • Temperaturgrenze • Limite de température • Límite de temperatura • Limite di temperatura • Limite de temperatura • Temperaturgränser • Temperaturområde • Όριο θερμοκρασίας	REF • Catalog Number • Katalognummer • Référence • Número de catálogo • Numero di catalogo • Número de catálogo • Katalognummer • Katalognummer • Αριθμός καταλόγου	i • Consult Instructions for Use • Gebrauchsanleitung beachten • Consulter la notice d'utilisation • Consulte las instrucciones de uso • Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso • Consulte as instruções de utilização • Se bruksanvisning före användande • Se brugsvejledningen • Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήση˜
Mfd. For • Manufactured For • Hergestellt für • Fabriqué pour • Fabricado para • Prodotto per • Fabricado para • Tillverkas för • Produceret for • Κατασκευάζεται για λογαριασμό της		

IgG | CAL | 1 • IgG Calibrator 1 • IgG Kalibrator 1 • Calibrateur d'IgG 1 • Calibrador de IgG 1 • Calibratore 1 per IgG • Calibrador IgG 1 • IgG-kalibrator 1 • IgG kalibrator 1 • Βαθμονομητής IgG 1	**IgG | CAL | 2** • IgG Calibrator 2 • IgG Kalibrator 2 • Calibrateur d'IgG 2 • Calibrador de IgG 2 • Calibratore 2 per IgG • Calibrador IgG 2 • IgG-kalibrator 2 • IgG kalibrator 2 • Βαθμονομητής IgG 2	**IgG | CAL | 3** • IgG Calibrator 3 • IgG Kalibrator 3 • Calibrateur d'IgG 3 • Calibrador de IgG 3 • Calibratore 3 per IgG • Calibrador IgG 3 • IgG-kalibrator 3 • IgG kalibrator 3 • Βαθμονομητής IgG 3	**IgG | CONJ** • IgG Conjugate • IgG-Konjugat • Conjugué d'IgG • Conjugado de IgG • Coniugato IgG • Conjugado de IgG • IgG-konjugat • IgG konjugat • Συζυγές IgG
IgG | CONTROL | – • IgG Negative Control • IgG-Negativkontrolle • Contrôle négatif d'IgG • Control negativo de IgG • Controllo negativo per IgG • Controlo Negativo IgG • IgG-negativ kontroll • IgG negativ kontrol • Αρνητικός μάρτυρας IgG	**IgG | CONTROL | +** • IgG Positive Control • IgG-Positivkontrolle • Contrôle positif d'IgG • Control positivo de IgG • Controllo positivo per IgG • Controlo Positivo IgG • IgG-positiv kontroll • IgG positiv kontrol • Θετικός μάρτυρας IgG	**IgG | MPLT** • IgG Microplate • IgG-Mikrotiterplatte • Microplaque IgG • Microplaca de IgG • Micropiastra per IgG • Microplaca IgG • IgG-mikroplatta • IgG mikroplade • Μικροπλάκα IgG	**SAMP | DIL** • Sample Diluent • Probendiluent • Diluant d'échantillon • Diluyente para muestras • Diluente per campione • Diluente de Amostras • Provdiluent • Prøvefortynder • Αραιωτικού δειγμάτων
STOP • Stop Solution • Stopplösung • Solution d'arrêt • Solución de parada • Soluzione bloccante • Solução de Paragem • Stopplösning • Stopopløsning • Ανασχετικό διάλυμα	**SUBS** • Substrate • Substrat • Substrat • Sustrato • Substrato • Substrato • Substrat • Substrat • Υπόστρωμα	**WSH | CONC** • Wash Concentrate • Waschkonzentrat • Solution de lavage concentrée • Concentrado de lavado • Soluzione di lavaggio concentrata • Concentrado de Lavagem • Tvättkoncentrat • Vaskekoncentrat • Συμπύκνωμα πλύσης	

Índice

Página

Indicaciones....2
Resumen y explicación de la prueba....2
Principios del procedimiento....2
Componentes del kit....3
Elementos adicionales necesarios....4
Precauciones y advertencias....4
Notas del procedimiento....5
Recogida y manipulación de las muestras....6
Preparación y almacenamiento de los reactivos....6
Indicaciones de inestabilidad o deterioro de los reactivos....7
Procedimiento....7
    Pasos del análisis....7
    Certificación/trazabilidad respecto a material de referencia....8
    Requisitos del control de calidad....8
Pautas para la interpretación de los resultados....9
Limitaciones del procedimiento....10
Rango de valores esperados....11
Características de rendimiento....11
    Especificidad....11
    Sensibilidad....12
    Precisión....12
    Recuperación....12
Información de seguridad del producto....13
Referencias....14



INDICACIONES

Análisis enzimático inmunoabsorbente (ELISA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG anticardiolipina en suero o plasma humanos.

Para la detección y semicuantificación de anticuerpos anticardiolipina en personas con lupus eritematoso diseminado (LED) y trastornos seudolúpicos (síndrome antifosfolipídico).

Para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los anticuerpos antifosfolípidos son autoanticuerpos que reaccionan con la mayoría de los fosfolípidos cargados negativamente, incluida la cardiolipina (CL).[1,2] Además, se sabe que los anticuerpos antifosfolípidos prolongan las pruebas de coagulación in vitro dependientes de fosfolípidos, y se han denominado tradicionalmente "anticoagulante lúpico".[1,3,4] Paradójicamente, las personas con el anticoagulante lúpico no presentan hemorragias anormales, excepto en presencia de otras anormalidades hemostáticas.[3]

Los anticuerpos anticardiolipina (aCL) suelen encontrarse frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso diseminado (LED). También se encuentran en personas que padecen otras enfermedades autoinmunitarias, así como en otras que no sufren ninguna enfermedad subyacente aparente.[1,5,6] Se han descrito concentraciones altas de anticuerpos aCL asociadas significativamente a la presencia de trombosis arterial y venosa, trombocitopenia y pérdida fetal recurrente. Para describir a las personas que presentan estas manifestaciones clínicas, junto con los anticuerpos aCL o el anticoagulante lúpico, se ha acuñado el término "síndrome antifosfolipídico" (APS).[6-10]

El kit de Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin Test de Bio-Rad utiliza un conocido formato de ELISA para detectar anticuerpos aCL en suero o plasma humanos. Los inmunoanálisis de fase sólida se consideran generalmente más sensibles[10] y más específicos[11] que los análisis de coagulación para detectar anticuerpos aCL. El kit de Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin IgG Test de Bio-Rad ofrece resultados rápidos, altamente reproducibles, precisos y objetivos en unidades homologables con una preparación de referencia internacionalmente reconocida. Los valores de anticuerpos IgG aCL se expresan en unidades GPL (IgG antifosfolípidos).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba se realiza como un ELISA indirecto. Las muestras diluidas de suero, los sueros calibradores y los controles se incuban en micropocillos recubiertos de cardiolipina, lo que permite que los anticuerpos aCL presentes en las muestras reaccionen con el antígeno inmovilizado. Después de eliminar las proteínas séricas no unidas mediante lavado, se añaden anticuerpos anti-IgG humana marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP), que forman complejos con los anticuerpos unidos a la cardiolipina. Tras otro paso de lavado, el conjugado enzima unida-anticuerpo se analiza añadiendo tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H_2O_2) como sustrato cromógeno. El color se desarrolla en los pocillos a una intensidad proporcional a la concentración sérica de anticuerpos aCL.

Los resultados se obtienen determinando la densidad óptica (DO) de cada pocillo con un espectrofotómetro. Se suministran sueros calibradores con las concentraciones de IgG aCL expresadas en unidades GPL. Estas unidades son homologables con las preparaciones reconocidas internacionalmente del Phospholipid Standardization Laboratory de la Universidad de Louisville. Una unidad GPL equivale a 1 µg/mL de una muestra de IgG estándar purificada por afinidad.[12]

Para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgG anticardiolipina en la muestra se ofrecen opciones de una curva de calibración de cuatro puntos y de una curva de calibración de un solo punto.

COMPONENTES DEL KIT

El kit de Anti-Cardiolipin IgG Test de Bio-Rad contiene suministros para 96 pruebas:

Componente		REF	Descripción	Kit para 96 pruebas REF 425-2000
IgG MPLT	Microplaca de IgG aCL	425-2001	96 micropocillos divisibles recubiertos con cardiolipina estabilizada de corazón bovino (difosfatidil glicerol), conservados herméticamente en bolsas de papel metalizado con cierre hermético y desecante.	12 x 8 pocillos
IgG CAL 1	IgG aCL Calibrador 1	425-2002	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades GPL en la etiqueta del frasco. Nocivo.*	0,25 mL
IgG CAL 2	IgG aCL Calibrador 2	425-2003	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades GPL en la etiqueta del frasco. Nocivo.*	0,25 mL
IgG CAL 3	IgG aCL Calibrador 3	425-2004	Suero humano. Consulte la concentración de anticuerpos en unidades GPL en la etiqueta del frasco. Nocivo.*	0,25 mL
IgG CONTROL +	IgG aCL Control positivo	425-2005	Suero humano. Consulte el rango esperado en unidades GPL en la etiqueta del frasco. Nocivo.*	0,25 mL
IgG CONTROL –	IgG aCL Control negativo	425-2006	Suero humano. Consulte el rango esperado en unidades GPL en la etiqueta del frasco. Nocivo.*	0,25 mL
IgG CONJ	Conjugado de IgG	425-2007	Solución de anticuerpos anti-IgG humana de cabra conjugados con HRP (azul); albúmina bovina; contiene timerosal y sulfato de gentamicina al 0,01% como conservantes.	15 mL
SAMP DIL	Diluyente para muestras	425-2008	Tampón fosfato salino (PBS) con azida sódica al 0,1% (solución verde). Contiene suero bovino. Nocivo.*	60 mL
SUBS	Sustrato	425-2009	Tetrametilbencidina (TMB) y agua oxigenada (H_2O_2); preparada para su uso.	15 mL
STOP	Solución de parada	425-2010	Ácido sulfúrico 0,36 N.	15 mL
WSH CONC	Concentrado de lavado	425-2011	Tampón fosfato salino (PBS) 33X.	2 x 30 mL

* **PRECAUCIÓN:** Contiene ≤ 0,1% sodium azide.

ELEMENTOS ADICIONALES NECESARIOS

Agua para reactivos para preparar solución de lavado PBS (2L)
Probeta graduada, 30 mL
Pipetas de precisión capaces de suministrar entre 5 y 1000 µL, con puntas apropiadas
Instrumentos de cristal apropiados para la manipulación de volúmenes pequeños
Matraz o botella de 1L
Botellas de lavado, preferiblemente con la punta parcialmente cortada hacia atrás para permitir un flujo amplio, o un sistema de lavado semiautomatizado
Guantes desechables
Espectrómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con una referencia de 620 nm, si se dispone de ella)
Pipetas multicanal capaces de transferir líquidos a 8 pocillos simultáneamente
Cronómetro de cuenta atrás
Pehachímetro

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. Cualquier material de origen humano debe considerarse infeccioso y manipularse utilizando los procedimientos de bioseguridad habituales.
2. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se manipulen las muestras de pacientes y los reactivos del kit.
3. No pipetee con la boca.
4. Utilice equipo de protección personal al manipular todos los reactivos y las muestras, y al emplear el lavador y el lector.
5. Deseche todos los residuos de acuerdo con las normativas nacionales y locales aplicables.
6. Algunos reactivos contienen azida sódica, que puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas explosivas. Tenga cuidado al desechar estos reactivos. Si se desechan en un desagüe, deje correr una gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azidas.
7. El material de desecho que contenga muestras de pacientes o productos biológicos debe considerarse biopeligroso al desecharse o tratarse.
8. Los reactivos químicos deben manipularse según las prácticas correctas de laboratorio.
9. El apartado *"Información de seguridad del producto"* contiene más información de seguridad y advertencias sobre los peligros químicos.
10. Los líquidos derramados deben limpiarse bien inmediatamente. Desinfecte las zonas en las que se hayan derramado materiales biopeligrosos. Deseche apropiadamente todo el material contaminado.
11. No utilice el kit después de la fecha de caducidad. La fecha está impresa en las cajas del kit.
12. Este producto utiliza suero humano en la fabricación del calibrador y los controles. Todas las unidades se han analizado con métodos aceptados por la FDA, y se ha comprobado que no son reactivas a los virus VIH-1 y VIH-2, ni a los virus de la hepatitis B (VHB), la hepatitis C (VHC) y la sífilis. Ningún método analítico puede garantizar con toda seguridad la ausencia de éstos y de otros agentes infecciosos en productos que contengan material

de origen humano. De acuerdo con las prácticas correctas de laboratorio, todo el material de origen humano debe considerarse potencialmente infeccioso de todos los agentes infecciosos; por lo tanto, manipule el calibrador y los controles con las mismas precauciones empleadas con las muestras de pacientes.

13. Para asegurar el funcionamiento correcto de este producto, es necesario seguir el protocolo especificado en estas instrucciones.
14. Nunca mezcle el contenido de diferentes frascos del mismo reactivo, ya que el reactivo podría resultar contaminado y comprometer el funcionamiento del producto.
15. Unos 30 minutos antes de comenzar el análisis, extraiga el kit de la cámara de refrigeración (entre 2 y 8 °C) y permita que los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C). Antes de utilizar los reactivos, mézclelos bien girando suavemente el recipiente varias veces. Después de utilizar el material, consérvelo a entre 2 y 8 °C.
16. No intercambie reactivos entre lotes del kit.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Lleve las muestras de suero y los reactivos del kit a la temperatura ambiente (entre 18 y 26 °C) y mézclelos bien antes de utilizarlos; evite la formación de espuma. Vuelva a guardar todas las muestras y reactivos no utilizados en un almacenamiento refrigerado tan pronto como sea posible.
2. Todas las diluciones de calibradores, controles y sueros de prueba deben hacerse justo antes de utilizarlas en el análisis.
3. El lector de placas debe programarse a cero utilizando un pocillo blanco con aire.
4. Para obtener un rendimiento óptimo del análisis, es esencial una buena técnica de lavado. La mejor forma de conseguir un lavado adecuado consiste en dirigir al fondo de los micropocillos un chorro a presión de solución de lavado apretando una botella de plástico de punta grande. La solución de lavado que haya en el pocillo blanco con aire no interferirá en el procedimiento. También puede utilizarse un sistema de lavado automatizado para placas de microvaloración.
5. **¡IMPORTANTE!** Si no se elimina bien los restos de PBS, la solución de sustrato puede desarrollar un color inadecuado.
6. Cuando sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de transferir líquidos a 8 pocillos simultáneamente. Esto agiliza el proceso y ofrece una incubación y unos tiempos de reacción más uniformes en todos los pocillos.
7. Es esencial que todos los pasos se realicen a su debido tiempo. Todos los calibradores, los controles y las muestras deben añadirse en un período de cinco minutos. El tamaño de los lotes de muestras no debe ser superior a la cantidad que pueda añadirse en dicho período de tiempo.
8. En todas las incubaciones, el período de incubación empieza al terminar de añadir los reactivos o las muestras. Se recomiendan períodos de incubación de 30 minutos, aunque con este formato pueden utilizarse períodos de incubación de hasta 40 minutos.

9. La adición de todas las muestras y los reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación superiores o inferiores a la temperatura ambiente normal (entre 18 y 26 °C) pueden producir resultados inexactos.
11. Evite la contaminación de los reactivos al abrir los frascos primarios y durante la extracción.
12. **No utilice Tween 20 ni otros detergentes en este análisis, ya que la presencia de restos de dichas sustancias puede afectar negativamente a la precisión del análisis.**
13. No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tipo de muestra

La matriz de muestras preferida es el suero, aunque también puede utilizarse plasma (consulte el apartado *"Muestras de plasma"*, más abajo).

Precaución en la recogida de muestras

Cualquier material de origen humano debe considerarse infeccioso y manipularse utilizando los procedimientos de bioseguridad habituales.

Aditivos y conservantes de las muestras

El plasma puede recogerse con la mayoría de los anticoagulantes, **excepto heparina.**

Tratamiento previo y almacenamiento de las muestras

Muestras de suero: La sangre debe recogerse mediante venopunción, y el suero debe separarse de las células mediante centrifugación después de la formación de coágulos. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse a entre 2 y 8 °C. Si las muestras tienen que almacenarse durante más de 72 horas, deberán congelarse a –20 °C o a una temperatura inferior. Evite las congelaciones y descongelaciones repetidas.

Muestras de plasma: Si el análisis se realiza inmediatamente, puede utilizarse plasma recogido con la mayoría de los anticoagulantes, **excepto heparina**. La sangre debe recogerse mediante venopunción, y el plasma debe separarse de las células mediante centrifugación a 1500 *g* durante 10 minutos. El sobrenadante debe retirarse con cuidado después de la centrifugación para evitar la contaminación con plaquetas; puede ser conveniente repetir los pasos de centrifugación y separación para reducir al mínimo la contaminación con plaquetas. Las plaquetas descompuestas o envejecidas pueden reaccionar con los anticuerpos antifosfolípidos, lo que produciría resultados aberrantes (riesgo de obtener resultados falsos negativos).

PRECAUCIÓN: No utilice suero ni plasma hemolizados, ictéricos o lipémicos, ya que podrían obtenerse resultados aberrantes. Las muestras que contengan partículas visibles deben clarificarse mediante centrifugación antes de analizarlas.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Todos los componentes del kit deben conservarse a entre 2 y 8 °C, y pueden emplearse hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. **No la congele.**

- Recoja todos los reactivos, las muestras y las diluciones necesarios antes de comenzar el análisis.
- Asigne y registre los pocillos de los controles y las muestras.

Solución de lavado

Mida 30 mL de concentrado de lavado (PBS 33X) y dilúyalo con agua para reactivos hasta obtener 1 litro. El pH de la solución final debe ser 7,35 ± 0,1. Tape y almacene la solución de lavado no utilizada en el refrigerador a entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de crecimiento microbiano, contaminación cruzada o decoloración.

Microplaca de IgG aCL

1. Preparados para su uso.
2. Tras abrir la bolsa, los pocillos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta si se vuelven a introducir inmediatamente en la bolsa de papel metalizado con desecante y ésta se vuelve a cerrar herméticamente y se almacena a entre 2 y 8 °C.
3. Guarde la gradilla para utilizarla en el futuro.

Diluyente para muestras

1. Preparados para su uso.
2. Deje que el diluyente para muestras alcance la temperatura ambiente antes de utilizarlo.
3. Mézclelo bien.
4. Evite la contaminación innecesaria.

Conjugado, sustrato y solución de parada

- Preparados para su uso.

Soluciones de trabajo 1:50

Prepárelas de la forma siguiente:

1. Diluya 10 µL de muestra de paciente en 490 µL de diluyente para muestras.
2. Diluya 10 µL de cada calibrador de IgG aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
3. Diluya 10 µL de control positivo de IgG aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
4. Diluya 10 µL de control negativo de IgG aCL en 490 µL de diluyente para muestras.
5. Deseche las soluciones de trabajo restantes después del uso.

INDICACIONES DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

No utilice reactivos que muestren señales de fugas.
Deseche la solución de lavado si muestra signos de crecimiento microbiano, contaminación cruzada o decoloración.

PROCEDIMIENTO

Pasos del análisis

1. El análisis puede realizarse con una curva de calibración de cuatro puntos (calibradores 1, 2 y 3, más diluyente para muestras/blanco de reactivo como calibrador 4 equivalente a 0 unidades GPL) o con una calibración de un punto (calibrador 3). Analice por duplicado los calibradores y los controles. Tanto con el método de varios puntos como con el de un solo punto debe procesarse un control blanco de reactivo; para lo que debe añadirse al pocillo diluyente para muestras sin suero. Este pocillo se tratará igual que los controles y las muestras de pacientes en pasos posteriores del análisis.

2. Retire de la gradilla todas las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar. Almacénelas con el desecante en la bolsa de cierre hermético suministrada.
3. Añada 100 µL de calibradores diluidos (incluido el blanco de reactivo/calibrador 4), controles y muestras de pacientes a los pocillos apropiados.
4. Incube de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente. Tras finalizar la incubación, invierta con cuidado los micropocillos y retire el líquido de las muestras. No permita que las muestras contaminen otros micropocillos.
5. Lave **4** veces con solución de lavado. Durante cada lavado, todos los pocillos deben llenarse con solución de lavado. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciarlos de líquido. Utilice un movimiento brusco de la muñeca para expulsar el líquido de los pocillos. La gradilla debe apretarse por las partes centrales inferior y superior para retener los módulos de micropocillos durante el lavado. Utilice papel absorbente para retirar el líquido de lavado residual. No permita que los pocillos se sequen entre un paso y otro.
6. Añada 100 µL de solución de anticuerpos anti-IgG humana conjugados con HRP (azul) a los pocillos correspondientes al calibrador IgG, los controles, el blanco de reactivo y las muestras de pacientes.
7. Incube entre 30 y 40 minutos a temperatura ambiente. Tras finalizar la incubación, invierta con cuidado los micropocillos y retire la solución de conjugado.
8. Lave **4** veces con solución de lavado, como en el paso 5. Utilice un movimiento brusco para expulsar el líquido y utilice papel absorbente para secar los micropocillos después del lavado final. No permita que los pocillos se sequen.
9. Añada 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo e incube de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente. Añada sustrato a los pocillos a una velocidad constante. En los pocillos con muestras positivas se desarrollará un color azul.
10. Añada 100 µL de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir solución de parada a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad con los que se añadió el sustrato. La solución de sustrato azul se volverá amarilla y la solución incolora permanecerá incolora. Lea la DO de cada pocillo a 450 nm. Los valores de DO deben medirse durante los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Certificación/trazabilidad respecto a material de referencia

Las concentraciones de IgG, expresadas en unidades GPL, de los calibradores de IgG aCL suministrados con este kit se indican en las etiquetas de los frascos. Estas unidades son homologables con las preparaciones reconocidas internacionalmente del Phospholipid Standardization Laboratory de la Universidad de Louisville. Una unidad GPL equivale a 1 µg/mL de una muestra de IgG estándar purificada por afinidad.[12]

Requisitos del control de calidad

Cada vez que se realice la prueba deberán incluirse un calibrador de IgG aCL, un control positivo de IgG aCL, un control negativo de IgG aCL y diluyente para muestras/blanco de reactivo.

PAUTAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Control de calidad:

Para que una prueba sea válida, deben cumplirse todos los siguientes criterios:

1. La DO media del calibrador 3 debe ser al menos 0,400 para asegurar que el kit está funcionando correctamente. Las lecturas de DO del calibrador 3 inferiores a 0,400 pueden indicar que el kit ya no está en condiciones para seguir utilizándose.
2. La DO media del calibrador 4 o el blanco de reactivo debe ser inferior a 0,050. Las lecturas superiores a 0,050 pueden indicar una posible contaminación del reactivo o un lavado inadecuado de las placas.
3. Los valores medios de laboratorio de los controles de anticuerpos anticardiolipina deben estar dentro del rango aceptable correspondiente indicado en las etiquetas de los recipientes. Pequeñas desviaciones ocasionales fuera de estos rangos son aceptables.
4. Los valores de DO de los duplicados de los controles o de las muestras de pacientes deben estar a menos de un 20% del valor medio de la DO en las muestras con lecturas de absorbancia superiores a 0,200.
5. Cada laboratorio debe determinar periódicamente sus propios valores discriminadores normales para la población adecuada de pacientes. Como ejemplo, consulte el apartado "*Especificidad*", dentro de "*Características de rendimiento*".

Si no se cumple alguno de estos criterios, los resultados no serán válidos y deberá repetirse la prueba.

Cálculo de los resultados:

Calibración de un punto

1. Calcule las DO medias de los duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Divida el valor de la concentración del calibrador 3 (indicado en la etiqueta del frasco) por la DO media de los duplicados del calibrador 3 para obtener el factor de conversión.
3. Multiplique la DO media de cada uno de los controles y las muestras de pacientes por el factor de conversión para obtener un valor de concentración en unidades GPL.

$$\textbf{Factor de conversión} = \frac{\text{Concentración de anticuerpos IgG anticardiolipina del calibrador 3 (GPL)}}{\text{Valor de absorbancia del calibrador 3 (DO)}}$$

La concentración de anticuerpos anticardiolipina de la muestra = Factor de conversión X Absorbancia de la muestra (DO)

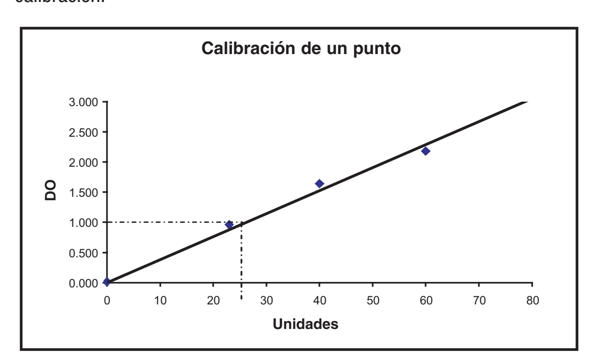
4. El factor de conversión debe calcularse para cada tanda analítica. Si se utiliza un factor de conversión de otro análisis, los resultados no serán válidos.
5. Las muestras con valores de anticuerpos anticardiolipina superiores a 100 GPL pueden clasificarse como "superiores a 100 GPL", o pueden diluirse con diluyente para muestras y volverse a analizar para obtener una estimación más precisa de la concentración de anticuerpos anticardiolipina. Los resultados del segundo análisis de estas muestras deben multiplicarse por el factor de dilución para obtener el valor final de anticuerpos anticardiolipina.



6. Asegúrese de que se han cumplido todos los parámetros de control de calidad (consulte el apartado *"Control de calidad")* antes de comunicar los resultados de la prueba.

Calibración con curva de varios puntos

1. Calcule las DO medias de los duplicados de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
2. Realice un análisis de regresión lineal con los valores de los cuatro calibradores (consulte la concentración en unidades GPL indicada en las etiquetas de los frascos; el calibrador 4 [diluyente para muestras] es igual a 0 GPL) respecto a las DO medias de cada calibrador.
3. La curva de los calibradores puede trazarse automáticamente mediante un programa informático validado, o manualmente en papel milimetrado. Al generar la línea de regresión, se recomienda utilizar una intersección de cero para evitar los valores negativos. Si no se dispone de esta opción, todos los valores negativos se considerarán iguales a cero. Al generar la curva manualmente, dibuje la línea de mejor ajuste a través de los puntos marcados con una intersección de cero.
4. Determine los valores de los controles y las muestras de pacientes a partir de la curva de calibración.



Utilizando la curva de calibración de ejemplo suministrada, a una muestra con una DO de 1,000 a 450 nm le correspondería un valor calculado de 26,2 unidades. La curva de calibración suministrada es solamente un ejemplo, y no debe utilizarse para calcular resultados de pacientes. En cada tanda analítica deberá generarse una nueva curva de calibración.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los valores de las concentraciones de anticuerpos anticardiolipina obtenidos con este análisis son solamente una ayuda para el diagnóstico. Cada médico debe interpretar estos resultados considerando los antecedentes del paciente, los datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos. Si los signos clínicos sugieren la presencia de anticuerpos antifosfolípidos y el paciente es negativo para anticuerpos anticardiolipina, algunos investigadores recomiendan hacer una prueba de anticoagulante lúpico para confirmar el resultado negativo. Se considera que un paciente es positivo para anticuerpos antifosfolípidos si es positivo en al menos una de las pruebas.[13]

Los pacientes que tengan o hayan tenido una infección sifilítica pueden obtener resultados positivos en la prueba Autoimmune EIA Anti-Cardiolipin IgG Test de Bio-Rad sin que haya un mayor riesgo de trombosis. En un estudio de 23 pacientes con sífilis confirmada (positivos en la prueba de FTA-Abs), nueve de las muestras

(39%) dieron positivo en la prueba Anti-Cardiolipin IgG Test de Bio-Rad. Si los antecedentes de un paciente apuntan a un posible diagnóstico de infección sifilítica, el diagnóstico debe confirmarse o descartarse mediante un análisis específico de anticuerpos antitreponémicos. Los anticuerpos anticardiolipina pueden aparecer temporalmente a bajas concentraciones durante muchas infecciones. Si un paciente da positivo en una primera prueba mientras hay signos clínicos de infección, la prueba debe repetirse después de seis meses.[14]

La cuestión de la interferencia de los anticuerpos reumatoideos (factor reumatoideo) debe tratarse con cuidado. Aún es necesario realizar más estudios para determinar la importancia clínica exacta, si la hay, de los anticuerpos aCL en la artritis reumatoide.

RANGO DE VALORES ESPERADOS

Tras analizar muestras de suero de 94 donantes de sangre sanos, se estableció el siguiente rango normal (media + 2 DE):

- < 23 GPL

Prevalencia esperada

LED:

Se utilizó el kit para analizar 149 muestras de suero de personas con LED. Treinta y una de las muestras (21%) dieron positivo en anticuerpos IgG anticardiolipina. No se encontró ninguna relación entre las concentraciones de anticuerpos anticardiolipina y las de anticuerpos anti-ADNbc o la actividad de la enfermedad. Se ha observado que los anticuerpos monoclonales anti-ADNbc y anti-ADNmc no reaccionan con los micropocillos recubiertos de cardiolipina del análisis.

Otros estados patológicos:

Se utilizó la prueba para analizar veinticuatro muestras de suero de personas con osteoartritis (OA). Sólo una dio positivo en anticuerpos IgG aCL.

Se utilizó la prueba para analizar noventa y tres muestras de suero de personas con esclerosis múltiple progresiva (EMP). Doce de las muestras (13%) dieron positivo en IgG aCL.

Aún se está investigando la importancia clínica de los resultados positivos en otros estados patológicos aparte del LED.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Especificidad

Muestras normales:

Se analizaron muestras de suero de 94 donantes de sangre sanos para comprobar la presencia de anticuerpos IgG aCL. El valor discriminador normal calculado fue la concentración media de anticuerpos en unidades GPL más dos desviaciones estándar. El valor calculado para IgG es 23 GPL. Utilizando este valor discriminador, el análisis es específico en un 97% para los anticuerpos IgG.

Controles patológicos:

Se utilizó la prueba para analizar muestras de suero de 14 personas con LED o un trastorno seudolúpico, sin antecedentes de trombosis ni otras características del síndrome antifosfolipídico. Ninguna de las muestras dio positivo en anticuerpos IgG aCL. La especificidad global del análisis en esta población de muestras fue del 100%.

Sensibilidad

Se utilizó la prueba para analizar muestras de suero de 18 personas con LED o un trastorno seudolúpico, de las que se sabía que habían tenido al menos un episodio trombótico. Diez de las muestras dieron positivo en anticuerpos IgG aCL, lo que arroja una sensibilidad de un 56% en esta población de muestras.

Precisión

Se analizaron dos muestras con valores GPL conocidos (uno bajo y otro alto) en 28 repeticiones en 3 ocasiones diferentes. Los coeficientes de variación (CV) intraanálisis e interanálisis se presentan en la tabla siguiente. El coeficiente de variación intraanálisis indicado es la media de los tres CV intraanálisis.

Muestra (conc. de aCL)	CV intraanálisis	CV interanálisis
Baja (20,1 GPL)	7,7%	11,9%
Alta (48,8 GPL)	9,4%	13,2%

Recuperación

Dos muestras con valores de concentración GPL conocidos (uno bajo, LS, y uno alto, HS) se diluyeron a una proporción 1:1 con estándares que contenían cantidades conocidas de anticuerpos IgG anticardiolipina. Los valores calculados, observados y de recuperación se presentan en la tabla siguiente. Los valores de concentración de anticuerpos anticardiolipina se indican en unidades GPL.

	Concentración GPL		
Muestra	Calculada	Observada	Recuperación
LS	--	11,0	--
LS + 6,3	8,7	8,8	101%
LS + 12,5	11,8	10,6	89,9%
LS + 25	18,0	17,0	94,2%
LS + 50	30,5	25,6	83,8%
HS	--	35,9	--
HS + 6,3	21,1	24,7	115%
HS + 12,5	24,2	27,7	115%
HS + 25	30,5	31,8	104%
HS + 50	43,0	39,8	92,6%

INFORMACIÓN DE SEGURIDAD DEL PRODUCTO

Diluyente para muestras, calibradores de IgG 1-3, control positivo de IgG y control negativo de IgG: R22, S36



Nocivo

R22	Nocivo por ingestión.
S36	Úsese indumentaria protectora adecuada.

Conjugado de IgG anticardiolipina

Advertencia: Este producto contiene sustancias químicas que el estado de California sabe causantes de defectos de nacimiento u otros daños relacionados con la reproducción. Contiene sulfato de gentamicina y timerosal al < 0,1%.

REFERENCIAS

1. Harris, E. N.; Gharavi, A. E.; Hughes, G. R. V. Anti-Phospholipid Antibodies. *Clin. Rheum. Dis.* **1985,** *11* (3), 591.
2. Gharavi, A. E.; Harris, E. N.; Asherson, R. A.; Hughes, G. R. V. Anti-Cardiolipin Antibodies: Isotype Distribution and Phospholipid Specificity. *Ann. Rheum. Dis.* **1987,** *46,* 1.
3. Espinoza, L. R.; Hartman, R. C. Significance of the Lupus Anticoagulant. *Am. J. Hematol.* **1986,** *22,* 331.
4. Elias, M.; Eldor, A. Thromboembolism in Patients with the "Lupus"-Type Circulating Anticoagulant. *Arch. Intern. Med.* **1984,** *144,* 510.
5. Fields, R. A.; Toubbeh, H.; Searles, R. P.; Bankhurst, A. D. The Prevalence of Anti-Cardiolipin Antibodies in a Healthy Elderly Population and Its Association with Antinuclear Antibodies. *J. Rheumatol* **1989,** *16,* 623.
6. Buchanan, R. R. C.; Wardlaw, J. R.; Riglar, A. G.; Littlejohn, G. O. Miller, M. H. Anti-Phospholipid Antibodies in Connective Tissue Diseases: Their Relation to the Anti-phospholipid Syndrome and Forme Fruste Disease. *J. Rheumatol.* **1989,** *16,* 757.
7. Hughes, G. R. V.; Harris, E. N.; Gharavi, A. E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheumatol.* **1986,** *13* (3), 486.
8. Asherson, R. A.; Harris, E. N. Anticardiolipin Antibodies-Clinical Associations. *Postgrad. Med. J.* **1986,** *62,* 1081.
9. Asherson, R. A. Antibodies to Phospholipid and the "Anti-Phospholipid Syndrome." *Immunology Updates* **1989,** *1* (2), 1.
10. Harris, E. N.; Gharavi, A. E.; Boey, M. L.; Patel, B. M.; Mackworth-Young, C. G.; Loizou, S.; Hughes,G. R. V. Anti-cardiolipin Antibodies: Detection by Radioimmunoassay and Association with Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus. *Lancet* **1983,** *ii,* 1211.
11. Triplett, D. A.; Brandt, J. T.; Kaczor, D.; Schaeffer, J. Laboratory Diagnosis of Lupus Inhibitors: A Comparison of the Tissue Thromboplastin Inhibition Procedure with a New Platelet Neutralization Procedure. *Am. J. Clin. Pathol.* **1983,** *79,* 678.
12. Harris, E. N.; Gharavi, A. E.; Patel, S. P; Hughes, G. R. V. Evaluation of the Anticardiolipin Antibody Test: Report of an International Workshop Held 4 April 1986. *Clin. Exp. Immunol.* **1987,** *68,* 215.
13. Harris, E. N. Solid Phase Anti-Cardiolipin Test Revisited. *Am. J. Med.* **1988,** *85,* 599.
14. Moore, J. E.; Mohr, C. F. Biologically False Positive Serologic Tests for Syphilis: Type, Incidence and Cause. *JAMA* **1952,** *150* (5), 467.

Contactos para obtener información técnica

Bio-Rad ofrece una línea telefónica gratuita de asistencia técnica, disponible 24 horas al día, 7 días a la semana. En Estados Unidos y Puerto Rico, llame al número gratuito 1-800-2BIORAD (224-6723).

Fuera de EE.UU., póngase en contacto con la oficina regional de Bio-Rad si necesita ayuda.



Bio-Rad Laboratories

Clinical Diagnostics Group

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-5824
www.bio-rad.com/diagnostics

AUSTRALIA	Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd. Unit 1 Block Y, 391 Park Road, Regents Park NSW 2143 Phone 61-2-9914-2800 • Telefax 61-2-9914-2888
AUSTRIA	Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna Phone 43-1-877-8901 • Telefax 43-1-876-5629
BELGIUM	Bio-Rad S.A.-N.V. Begoniastraat 5, B-9810 Nazareth Eke Phone 32-9-385-5511 • Telefax 32-9-385-6554
BRAZIL	Bio-Rad do Brasil, Rua dos Invalidos 212, 5 Andar, Lapa CEP 20231-020, Rio de Janeiro Phone 5521-3461-5202 • Telefax 5521-2221-6524
CANADA	Bio-Rad Laboratories, Ltd., 2403 Guénette Montreal, Québec H4R2E9 Phone 1-514-334-4372 • Telefax 1-514-334-4415
CZECH REPUBLIC	Bio-Rad spol. s.r.o., Nad ostrovem 1119/7, 147 00 Prague 4 Phone 420-2-41430532 • Telefax 420-2-41431642
CHINA	Bio-Rad China Limited, 18F/D Hai Li Building, No. 88 Da Pu Road, Shanghai 200023 Phone 86-21-63052255 • Telefax 86-21-53964775
DENMARK	Bio-Rad Laboratories, Generatorvej 8 C, 2730 Herlev Phone 45-4452-1000 • Telefax 45-4452-1001
FINLAND	Bio-Rad Laboratories, Pihatorma 1 A, FIN-02240 Espoo Phone 358-9-804-22-00 • Telefax 358-9-804-11-10
FRANCE	Bio-Rad S.A., 3 boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette Phone 33-1-4795-6000 • Telefax 33-1-4741-9133
GERMANY	Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 Munich Phone 49-89-318840 • Telefax 49-89-318-84100
HONG KONG	Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F, DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay Phone 852-2789-3300 • Telefax 852-2789-1257
INDIA	Bio-Rad Laboratories (India) Pte. Ltd., B&B1, Enkay Towers, Vanijya Nikunj, Udhyog Vihar, Phase-V, Gurgaon, 122016 Haryana Phone 91-124-6398112• Telefax 91-124-6398115
ISRAEL	Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75655 Phone 972-3-9514127 • Telefax 972-3-9514129
ITALY	Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan Phone 39-02-216091 • Telefax 39-02-21609-298
JAPAN	Nippon Bio-Rad Laboratories, 7-18, Higashi-Nippori 5-chome, Arakawa-ku, Tokyo 116-0014 Phone 81-3-5811-6290 • Telefax 81-3-5811-6282
KOREA	Bio-Rad Korea Ltd., B1. Cambridge Building, 1461-15, Seocho-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-070 Phone 82-2-3473-4460 • Telefax 82-2-3472-7003
LATIN AMERICA	Bio-Rad Latin America, 14100 Palmetto Frontage Road, Suite 101, Miami Lakes, Florida 33016 Phone 305-894-5950 • Telefax 305-894-5960
MEXICO	Bio-Rad Laboratorios Mexico, S.A. de C.V., Adolfo Prieto No 1653, Colonia Del Valle, 03100 Mexico, D.F. Phone 5255-5534-2552 • Telefax 5255-5524-5555
THE NETHERLANDS	Bio-Rad Laboratories BV, Fokkerstraat 10, 3905 KV Veenendaal Phone 31-318-540666 • Telefax 31-318-542216
NEW ZEALAND	Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road, Albany, Auckland Phone 64-9-415-2280 • Telefax 64-9-415-2284
NORWAY	Bio-Rad Laboratories, Johan Scharffenbergs vei 91, N-0694, Oslo Phone 47-23-38-41-30 • Telefax 47-23-38-41-39
POLAND	Bio-Rad Polska Sp. z o.o., Nakielska Str. 3, 01-106 Warsaw Phone 48-22-3319999 • Telefax 48-22-3319988
PORTUGAL	Bio-Rad Laboratories, Rua do Entreposto Industrial, 3-1º Esq., 2724 - 513, Amadora Phone 351-21-472-7700 • Telefax 351-21-472-7777
RUSSIA	Bio-Rad Laboratories Ltd., 37/A14 Leningradsky Pr., 125167 Moscow Phone 7-095-721-14-00 • Telefax 7-095-721-14-12
SINGAPORE	Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 27 International Business Park, #01-02, 609924 Phone 65-6415-3188 • Telefax 65-6415-3189
SOUTH AFRICA	Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Road, Parkwood, Johannesburg 2193 Phone 27-11-442-85-08 • Telefax 27-11-442-85-25
SPAIN	Bio-Rad Laboratories S.A., Miniparc II, Edificio M, C/ Calendula 95, El Soto de la Moraleja, 28109 Madrid Phone 34-91-590-5200 • Telefax 34-91-590-5211
SWEDEN	Bio-Rad Laboratories A.B., Vintergatan 1, Box 1097, S-172 22, Sundbyberg Phone 46-8-555-127-00 • Telefax 46-8-555-127-80
SWITZERLAND	Bio-Rad Laboratories, Nenzlingerweg 2, CH-4153 Reinach BL Phone 41-61-717-95-55 • Telefax 41-61-717-95-50
THAILAND	Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Rd., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 Phone 662-651-8311 • Telefax 662-651-8312
UNITED KINGDOM	Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maylands Ave., Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD Phone 44-208-328-2000 • Telefax 44-208-328-2550

Effective Date: *Febrero 2006*